

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-255328
(P2001-255328A)

(43)公開日 平成13年9月21日(2001.9.21)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	デ-マコ-ト ⁸ (参考)
G 0 1 N	33/566	G 0 1 N	33/566
C 1 2 M	1/00	C 1 2 M	1/00
C 1 2 N	15/09	C 1 2 Q	1/68
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N	21/78
G 0 1 N	21/78		31/22
			1 2 1 P
			4 B 0 2 9
			4 B 0 2 9
審査請求	未請求	請求項の数 9	OL (全 12 頁)
			最終頁に続く

審査請求 未請求 請求項の数 9 OL (全 12 頁) 最終頁に統ぐ

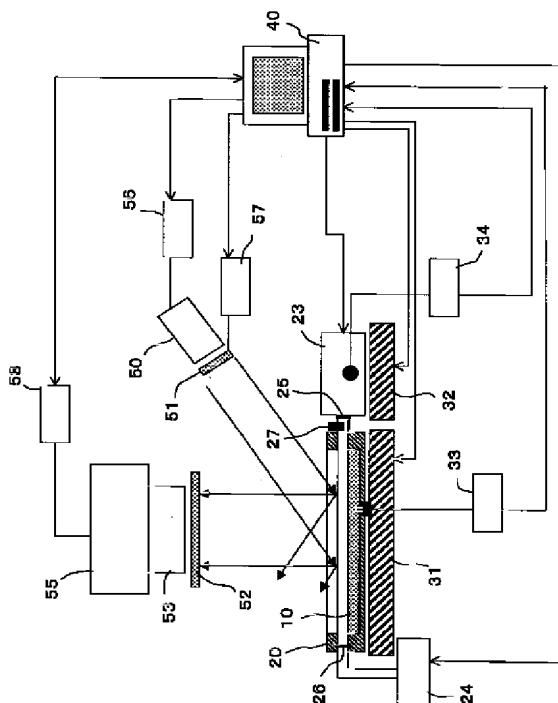
(21)出願番号	特願2000-67684(P2000-67684)	(71)出願人	000233055 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
(22)出願日	平成12年3月10日(2000.3.10)	(72)発明者	中尾 素直 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内
(74)代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外1名)		

(54) 【発明の名称】 ハイブリダイゼーション反応検出方法及び検出装置

(57) 【要約】

【課題】 ハイブリダイゼーションによる特異的な結合のみの検出及び定量を行う。

【解決手段】 多数のプローブ生体高分子がスポットされたバイオチップ10を容器20に収容し、輸液装置23から洗浄液を流す。ヒートブロック31によってバイオチップの温度を予め定められた時間パターンに従って制御し、バイオチップのスポット面を決められた時間間隔で撮像手段55によって撮像する。撮像手段によって撮像された複数の画像はコンピュータ40に記憶し、個々のスポットについて画像を解析することで、プローブの種類に応じてスポット毎に異なるハイブリダイゼーションの最適温度の影響を受けることなく全てのスポットにおいてハイブリダイゼーションを高い信頼性を持って検出する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 多数のプローブ生体高分子が個別にスポットされた反応領域を有するバイオチップに試料生体高分子を結合させるステップと、前記バイオチップの温度を上昇させながら個々のスポットにおけるハイブリダイゼーション反応を検出するステップとを含むことを特徴とするハイブリダイゼーション反応検出方法。

【請求項2】 請求項1記載のハイブリダイゼーション反応検出方法において、前記ハイブリダイゼーション反応を検出するステップでは前記バイオチップの反応領域に洗浄液を流すことを特徴とするハイブリダイゼーション反応検出方法。

【請求項3】 多数のプローブ生体高分子が個別にスポットされた反応領域を有するバイオチップを容器に収容するステップと、

前記容器内に試料生体高分子を注入するステップと、前記容器内のバイオチップを一定温度に保持するステップと、

前記容器内に洗浄液を流しながら前記バイオチップの温度を予め設定した時間パターンに従って変化させるとともに、予め設定したタイミング毎に前記バイオチップの反応領域の画像を撮像するステップとを含むことを特徴とするハイブリダイゼーション反応検出方法。

【請求項4】 請求項3記載のハイブリダイゼーション反応検出方法において、前記試料生体高分子には蛍光標識が付けられており、前記画像からスポット毎の蛍光強度を解析するステップを更に含むことを特徴とするハイブリダイゼーション反応検出方法。

【請求項5】 請求項4記載のハイブリダイゼーション反応検出方法において、各スポットにおける蛍光強度の時間変化の情報から当該スポットに固定されたターゲット生体高分子と試料生体高分子とのハイブリダイゼーション反応の程度を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション反応検出方法。

【請求項6】 請求項4又は5記載のハイブリダイゼーション反応検出方法において、スポットからの蛍光強度が急減したときの温度情報を取得することを特徴とするハイブリダイゼーション反応検出方法。

【請求項7】 多数のプローブ生体高分子が個別にスポットされた反応領域を有するバイオチップを収容する容器と、

前記容器内に収容されたバイオチップの温度を予め定められた時間パターンに従って制御する温度制御手段と、前記容器に洗浄液を供給する手段と、

前記容器に収容されたバイオチップの反応領域を撮像する撮像手段と、

前記撮像手段の撮像タイミングを制御する手段と、前記撮像手段によって撮像された複数の画像を記憶する記憶手段とを含むことを特徴とするハイブリダイゼーシ

ョン反応検出装置。

【請求項8】 請求項7記載のハイブリダイゼーション反応検出装置において、前記温度制御手段は、バイオチップの温度を時間とともに単調に上昇する時間パターンに従って制御することを特徴とするハイブリダイゼーション反応検出装置。

【請求項9】 請求項7又は8記載のハイブリダイゼーション反応検出装置において、選択されたスポットからの蛍光強度の時間変化を表示する機能を有することを特徴とするハイブリダイゼーション反応検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バイオチップ上にスポットしたプローブDNA等のプローブ生体高分子と蛍光標識あるいは化学発光標識したDNA等の試料生体高分子とのハイブリダイゼーション反応を検出するハイブリダイゼーション反応検出方法及び検出装置に関する。

【0002】

【従来の技術】分子生物学や生化学の分野では、有用な遺伝子の探索や病気の診断などのために生体内の核酸や蛋白質などの生体高分子を同定・分画することが行われ、その際の前処理として、既知の配列をもつ核酸や蛋白質と試料中のターゲット分子とをハイブリダイズさせるハイブリダイゼーション反応が多用されている。このとき短時間で大量の試料を処理するために、表面に多数のフィーチャーをマトリックス状に設定したバイオチップが用いられる。バイオチップ上の各フィーチャーには、例え、それぞれ異なるDNAプローブがスポットされ固定されている。このバイオチップを試料DNAと共に反応容器の中に入れ、反応容器内でバイオチップの各フィーチャーに結合させたプローブと蛍光標識した試料DNAとのハイブリダイゼーションを行う。その後、バイオチップに励起光を照射し、各フィーチャーから発せられる蛍光の蛍光強度を測定することによって各プローブと試料DNAとの結合量を知り、それを必要な情報に変換するものである。

【0003】図13は、バイオチップを用いた従来のハイブリダイゼーション反応の説明図である。まず、図13(a)に示すように、多数のDNAスポットが設定されたバイオチップ110のDNAスポット部分112に試料DNA溶液114をのせた後にカバーガラス116をかぶせる。次に、図13(b)に示すように、それを密閉容器120の中に閉じこめた状態で、温度コントローラを備えるチャンバー内にてハイブリダイゼーションを行う。このときにチャンバー内の温度は一定とされる。通常、ハイブリダイゼーションの最適温度はそれぞれのDNAスポット毎に異なるが、その平均の温度に設定して全てのスポットに対してハイブリダイゼーションを行う。その後バイオチップを洗浄し、ハイブリダイゼ

ーションしていない試料DNAを取り除いた後に、試料DNAにラベルしてある蛍光物質等による発光を蛍光読み取り装置で読み取る。

【0004】

【本発明が解決しようとする課題】従来の技術によると、ハイブリダイゼーションを行う際に、バイオチップの各スポット毎に最適温度は違うにもかかわらずその平均解離温度に設定してハイブリダイゼーションを行う。そのため、設定された平均温度より最適温度が低いスポットでは、相補的なDNA同士の結合が維持できないためハイブリダイゼーション効率が落ち、検出される信号強度は本来の強度より下がる。逆に、最適温度が平均温度より高いスポットの場合には非特異的な結合をまねき、実際に相補的なDNA以外のDNAも結合することにより、検出される信号強度は本来の強度より上がる。このように、従来のバイオチップのハイブリダイゼーション検出方法では、スポット毎にハイブリダイゼーションの最適温度が違うにも拘わらず同一温度にてハイブリダイゼーションを行い、その後、蛍光読み取り装置により最終的に読み取った結果をもとにDNAの量比を比べてきた。そのため、その定量性に疑問があった。本発明は、このような従来技術の問題点に鑑み、ハイブリダイゼーションによる特異的な結合のみの検出及び定量を行うことのできるハイブリダイゼーション検出方法及び検出装置を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するために、本発明ではバイオチップの設定温度を時間毎にプログラムできる制御装置をもち、励起光源と検出用の冷却CCDカメラを搭載する。低温でバイオチップの全てのスポットのプローブ生体高分子に試料生体高分子をハイブリダイズさせた後に温度制御して徐々に温度を上げながら洗浄液を輸液し、各温度においてバイオチップ全面を撮像し、スポット毎の蛍光検出を行う。このように温度を低温側から高温側に変化させながらハイブリダイゼーションの状況を確認することで、プローブ生体高分子の種類に応じてスポット毎に異なるハイブリダイゼーションの最適温度の影響を受けることなく全てのスポットにおいてハイブリダイゼーションを高い信頼性を持って検出する。

【0006】すなわち、本発明によるハイブリダイゼーション反応検出方法は、多数のプローブ生体高分子が個別にスポットされた反応領域を有するバイオチップに試料生体高分子を結合させるステップと、バイオチップの温度を上昇させながら個々のスポットにおけるハイブリダイゼーション反応を検出するステップとを含むことを特徴とする。

【0007】ハイブリダイゼーション反応を検出するステップではバイオチップの反応領域に洗浄液を流すのが好ましい。洗浄液を流すことで、プローブ生体高分子に

ハイブリダイズしていない試料生体高分子あるいはプローブ生体高分子から解離した試料生体高分子はスポットから除去され、検出の際のノイズを低減することができる。

【0008】本発明によるハイブリダイゼーション反応検出方法は、また、多数のプローブ生体高分子が個別にスポットされた反応領域を有するバイオチップを容器に収容するステップと、容器内に試料生体高分子を注入するステップと、容器内のバイオチップを一定温度に保持するステップと、容器内に洗浄液を流しながらバイオチップの温度を予め設定した時間パターンに従って変化させるとともに、予め設定したタイミング毎にバイオチップの反応領域の画像を撮像するステップとを含むことを特徴とする。容器内のバイオチップを一定温度に保持するステップでは、バイオチップを比較的低温に比較的長時間保持して、注入された試料生体高分子をスポットのプローブ生体高分子にハイブリダイズさせる。容器内に洗浄液を流しながら変化させるバイオチップの温度は、時間とともに単調に上昇する時間パターンで変化するのが好ましい。

【0009】試料生体高分子に蛍光標識を付けておき、前記画像からスポット毎の蛍光強度を解析するようするものが好ましい。各スポットにおける蛍光強度の時間変化の情報から当該スポットに固定されたターゲット生体高分子と試料生体高分子とのハイブリダイゼーション反応の程度を検出することができる。また、蛍光強度が急減したときの温度情報を取得すると、その温度をプローブ生体高分子の分子構造から予想される解離温度と比較することでハイブリダイゼーション反応検出の信頼性を高めることができる。スポットからの蛍光強度が急減したときの温度がそのスポットに固定されたプローブ生体高分子の予想解離温度にほぼ等しい場合には特異的なハイブリダイゼーションが生じていたと判断でき、両者が明らかにかけ離れた値である場合は非特異的に試料生体高分子が結合していたと判断できる。

【0010】本発明によるハイブリダイゼーション反応検出装置は、多数のプローブ生体高分子が個別にスポットされた反応領域を有するバイオチップを収容する容器と、容器内に収容されたバイオチップの温度を予め定められた時間パターンに従って制御する温度制御手段と、容器に洗浄液を供給する手段と、容器に収容されたバイオチップの反応領域を撮像する撮像手段と、撮像手段の撮像タイミングを制御する手段と、撮像手段によって撮像された複数の画像を記憶する記憶手段とを含むことを特徴とする。温度制御手段は、バイオチップの温度を時間とともに単調に上昇する時間パターンに従って制御するのが好ましい。また、選択されたスポットからの蛍光強度の時間変化を表示装置上に表示する機能を有することが好ましい。

【0011】

【本発明の実施の形態】以下、図面を参照して本発明の実施の形態について説明する。以下では、プローブ生体高分子（以下、単にプローブという）及び試料生体高分子としていずれもDNAを用いる場合について説明する。ただし、本発明の適用はこのような組み合わせの場合のみに限られるものではなく、生体高分子がRNAやアミノ酸（蛋白質）、糖鎖、またはそれらの複合物（糖蛋白質糖）である場合にも同様に適用可能である。

【0012】図1は、本発明で用いるバイオチップの一例を示す概略図である。図1(a)に示すように、バイオチップ10は、スライドガラスなどの基板上に設定された反応領域15にDNA等のプローブを多数スポットして固定したものである。バイオチップ10上の各スポット11にはそれぞれ異なるプローブがスポットされており、多種類のターゲットDNAに対してそれぞれ特異的にハイブリダイゼーションを行う。

【0013】図1(b)に示すように、DNAは4種類の塩基、すなわちA(アデニン)、T(チミン)、C(シトシン)、G(グアニン)を含む核酸から構成されており、このうちA(アデニン)はT(チミン)に対して、C(シトシン)はG(グアニン)に対して水素結合を形成する。AとTは2本、CとGは3本の水素結合を形成し、これら以外の組み合わせでは水素結合を形成しない。ハイブリダイゼーションとはDNAが相補的なDNAとお互いに水素結合し、化学的に結合することを示し、このときの結合エネルギーはDNAの構成塩基により推測できる。そのために、ハイブリダイゼーション反応で特異的に結合したDNA同士の解離温度Tmも以下の〔数1〕により推測することができる。AとTの水素結合は2本、CとGの水素結合は3本であるので、CGの含有量が高いと通常結合エネルギーは高くなる。〔数1〕には、そのことが考慮されている。

【0014】

【数1】

$$T_m(\text{C}) = 81.5 + 16.6 \times \log[S] + 0.41 \times (\%GC) - (500/n)$$

【0015】ここで、〔S〕は塩のモル数、(%GC)はオリゴヌクレオチド中のGC含量(%)、nはオリゴヌクレオチドの長さ(p b)である。ただし、前記〔数1〕はあくまでも目安であり、通常、隣の分子(ここではDNA)等などからも影響を受けるため、あるいはDNAの内部にお互いの相補鎖部分を持ち、その部分で水素結合を形成してしまう現象(自己相補鎖)等により誤差が生じることもある。

【0016】図2は、本発明によるチップハイブリダイゼーション反応検出装置の一例の概要を示す図である。このハイブリダイゼーション反応検出装置は、ハイブリダイゼーション反応部と蛍光検出部を備える。ハイブリダイゼーション反応部は、チップケース20内のバイオチップ10上に洗浄液を供給する加圧式輸液装置23、チップケース20内のバイオチップ10を加熱するため

のヒートブロック31、加圧式輸液装置23内の溶液を加熱するためのヒートブロック32、バイオチップ10の温度を計測する温度計測器33、加圧式輸液装置23内の溶液温度を計測する温度計測器34等を備える。温度計測器33、34の出力はコンピュータ40に入力され、コンピュータ40はヒートブロック31、32の制御を行う。蛍光検出部は、励起光源50、励起用光学フィルター51、受光用光学フィルター52、受光光学系53、撮像装置(冷却CCDカメラ)55等を備える。励起光源50、光学フィルター51、52、撮像装置55はそれぞれコントローラ56、57、58を介してコンピュータ40によって制御される。コンピュータ40は、装置各部の制御に加えて、内部に組み込んだデータ解析プログラムによって撮像装置55で撮像した画像の画像処理、データ解析、解析結果の表示等の処理を行う。

【0017】図3は、コンピュータの表示画面の一例を示す概略図である。この表示画面41には設定値表示部60、読み取り画像表示部61、動作状況表示部62、操作用のボタン71~75、及び各種ツール81~85が表示されている。設定値表示部60には撮影の設定値等が表示され、読み取り画像表示部61には一番最近に撮影したバイオチップ10の蛍光画像が表示されている。動作状況表示部62には、現在の装置の状態が表示されている。また、表示画面41には、表示ウィンドウを切り替えることで図1に示すグラフや図12に示す表等も表示することができる。

【0018】チップ温度制御ボタン71は、バイオチップ10の温度設定を行うためのボタンである。このボタン71を押して図示しないチップ温度制御ウィンドウを開き、そのウィンドウ内でバイオチップの温度の時間変化パターンを設定する。コンピュータ40は温度計測器33、34により読み取った現在の温度と設定温度とを比較してペルチェ式ヒートブロック31、32により加熱制御を行う。CCDカメラボタン72は、冷却CCDカメラ55の制御を行うためのボタンである。CCDカメラボタン72を押して図示しないカメラ設定ウィンドウを開き、そのウィンドウ内で冷却CCDカメラ55の冷却温度、撮影の間隔、シャッタースピード等の設定を行う。フィルターボタン73を押すと図示しないフィルター設定ウィンドウが開き、そのウィンドウ内で標識蛍光物質の種類に合わせて励起用光学フィルター51及び受光用光学フィルター52の選択を行うことができる。フィルター切り替えユニット57は、フィルターボタン73を押して行った設定に従って目的とする蛍光物質に適合するように励起用光学フィルター51と受光用光学フィルター52を同時に選択し切り替える。送液ポンプボタン74を押すと図示しない設定ウィンドウが開き、加圧式輸液ポンプ23内の洗浄液の温度設定や流量の設定、輸液のオン・オフ設定を行うことができる。ハロゲ

ンランプボタン75を押すとランプ条件の設定ウィンドウが開き、励起光源であるハロゲンランプ50の電源電圧を設定できる。ハロゲンランプコントローラ56はこの設定に従ってハロゲンランプ50を制御して励起光の強さを調整する。

【0019】図4は、コンピュータへのデータの流れとコンピュータによる装置各部の制御の関係を示す概略図である。図中、コンピュータ40に向かう矢印はコンピュータ40へのデータ入力を表し、コンピュータ40から出る矢印はコンピュータ40からの機器各部への指令、制御を表す。コンピュータ40は、設定値表示部60に表示されている設定条件に従って、ヒートブロック31、32の温度、冷却CCDカメラ55の温度を制御し、ハロゲンランプコントローラ56及びフィルター切り替えコントローラ57を制御する。また、加圧式輸液装置23のポンプ及び吸引式排液装置24を制御する。バイオチップ10及び加圧式輸液ポンプ23の温度データは温度計測器33、34からコンピュータ40に取り込まれ、動作状況表示部62に表示される。更に、コンピュータ40は、設定された撮影間隔でカメラコントローラ58から出力されるバイオチップ10の蛍光画像データを順次取り込み、記憶装置に保存する。

【0020】次に、このチップハイブリダイゼーション反応検出装置によるハイブリダイゼーション反応及びハイブリダイゼーション検出のための操作及び制御について説明する。まず、予め用意しておいたバイオチップ10をチップケース20内にセットし、加圧式輸液装置23からチップケース20への輸液経路の途中に設けられた溶液注入孔27に蛍光標識した試料DNA溶液を注入する。注入された試料DNA溶液は、加圧式輸液装置23から送られるハイブリダイゼーション溶液（洗浄液としても用いる）の流れに乗ってチップケース20内に流れ込む。試料DNA溶液がチップケース20内に入ったら加圧式輸液装置23の運転を停止してハイブリダイゼーション溶液の流れを止め、ヒートブロック31を制御してチップケース20及びバイオチップ10を比較的低温（37°Cぐらい）に保持し、長時間ハイブリダイゼーションを行う。

【0021】その後、蛍光検出部によってバイオチップ10のハイブリダイゼーションの状態を確認するときには、加圧式輸液装置23からバイオチップ10を入れたチップケース20に洗浄用の溶液を設定された流量で送液し、バイオチップ10のプローブDNAとハイブリダイズしていない試料DNAを洗浄液とともに吸引式排液装置24によって汲み出す。洗浄液としては、ハイブリダイゼーション溶液と同じ溶液を用いることができる。チップケース20への洗浄液流入部と流出部には逆流防止弁25、26が設けられており、洗浄液の逆流を防いでいる。その後、励起光源50からバイオチップ10の全域に励起光が照射される。この例では励起光源50と

してハロゲンランプを用い、励起用光学フィルター51を通して試料DNAに標識された蛍光物質の励起に最適な波長の光のみをバイオチップ10に照射する。なお、化学発光等を用いて検出を行う場合は励起光を必要としないので、励起光源50を切って使用する。

【0022】図5は、蛍光検出部によるハイブリダイゼーション状態確認の際に、チップハイブリダイゼーション反応装置のハードウェアを制御しているプログラムによって実行される処理のフローチャートである。図の右側には、各制御に対応する表示画面（図3参照）41上の表示部あるいは設定ボタンを示す。

【0023】まず、温度計測器33によってバイオチップ10の温度測定を行う（S11）。計測結果は、動作状況表示部62に表示する。次に、計測された温度とチップ温度制御ボタン71を用いて予め設定された各時刻毎の温度とを比較し、計測された温度がその時刻の設定温度と等しくなるようにヒートブロック31を制御する（S12）。温度計測器34によって加圧式輸液装置23の温度計測を行い、計測結果を動作状況表示部62に表示する（S13）。同様に、加圧式輸液装置23の温度が設定温度になるようにヒートブロック32を制御する（S14）。次に、加圧式輸液装置23のポンプを制御して、送液ポンプボタン74を介して設定された流量に従って洗浄液をバイオチップケース20内に送液する（S15）。それとともに吸引式排液装置24を制御して余分の洗浄液を吸引除去する（S16）。

【0024】また、検出すべき標識蛍光物質の励起波長及び蛍光波長に適合するように、フィルター切り替えコントローラ57を制御して、フィルターボタン73で設定された通りに励起用光学フィルター51及び受光用光学フィルター52をセットする（S17）。続いて、ハロゲンランプボタン75にて設定されたように、ハロゲンランプコントローラ56を制御して光源強度を設定する（S18）。次に、CCDカメラボタン72で設定された設定に従ってCCDカメラコントローラ58を制御し、設定条件に従って冷却CCDカメラ55によってバイオチップ10を撮影する（S19）。撮影した画像はコンピュータ40の記憶装置に保存するとともに、表示装置の読み取り画像表示部61に表示する（S20）。このような流れで測定のための制御が行われ、最終的にコンピュータ40の記憶装置に冷却CCDカメラ55で撮影されたバイオチップ1の画像ファイルが順次保存されていく。

【0025】通常、低温でハイブリダイゼーションを行うと、プローブDNAに対して相補性の低い試料DNAもハイブリダイズする。本発明では、バイオチップ10及びその周囲の温度を予め定められた時間パターンに従って時間とともに徐々に上昇させながら、ハイブリダイゼーションの検出を行う。時間とともに変化させるべきバイオチップ10の温度の時間パターンはチップ温度制

御ボタン71によって予めコンピュータ40に設定されている。コンピュータ40は、温度計測器33によって測定した現在の温度を設定温度と比較し、バイオチップ10の温度が設定された時間パターンに従って変化するようにペルチェ式ヒートブロック31を制御して温度調整を行う。コンピュータ40はまた、温度計測器34によって加圧式輸液装置23から送液される溶液の温度を計測し、その温度がチップケース20内のバイオチップ10と同じ温度になるようにペルチェ式ヒートブロック32を制御する。こうして、加圧式輸液装置23はバイオチップ10と同じ温度に制御された溶液をポンプによってチップケース20に送液する。加圧式輸液装置23からの溶液の送液と同時に、吸引式排液装置24によってチップケース20内から廃液が吸引される。

【0026】洗浄液とバイオチップ10の温度を次第に上昇させてゆくと、相補性の低い試料DNAほど低い温度で早期に解離していく。最後には相補性の高い試料DNA、すなわち目的とするターゲットDNAのみがプローブに結合した状態になると考えられるが、それもバイオチップ10及びその周囲温度がその解離温度を超えると結合を維持できなくなるため解離する。すると、そのスポットからの蛍光強度は急激に低下する。このように、解離温度近く（解離温度よりわずかに低い温度）で検出されたハイブリダイゼーションがターゲットとのハイブリダイゼーションであると考えられる。

【0027】ここでは、蛍光物質としてCy3（励起波長550nm、蛍光波長570nm）を標識した試料DNAを用いてハイブリダイゼーションを行った。蛍光物質が発する蛍光は受光用光学フィルター52で選択的に透過され、受光レンズ53により集光され、高感度の冷却CCDカメラ55により撮像される。CCDカメラ55の出力はカメラコントローラ58を介してコンピュータ40に送られる。なお、この装置では多種の蛍光物質に対応できるように、励起用光学フィルター51及び受光用光学フィルター52は切り替えコントローラ57により交換可能になっている。

【0028】冷却CCDカメラ55によるバイオチップ10の全面の像は、設定値表示部60に示されている条件（図の例では5分間隔）に従って自動的に撮像され画像表示部61に表示されると共に、画像データとしてコンピュータ40の記憶装置に順次記憶される。次に、バイオチップ10の蛍光画像から得られた情報を解析して時間、温度の変化とともに表示する手順について以下に説明する。

【0029】図6は、データ解析プログラムの処理内容を説明するブロック図であり、コンピュータからのデータの取り出し及び各サブプログラムへの制御の概略を示してある。図の左向きの矢印はデータ読み込み処理を表し、右向きの矢印は指令や制御を表す。

【0030】解析プログラムは、スポット指定、バック

グラウンド計算、スポット強度計算、スポット有効強度計算、Tm値（予想解離温度）計算、判定、及び結果表示のためのサブプログラムを含んでいる。スポット指定はキーボードやマウス等の入力機器を用いて行われ、読み込まれた時間毎の画像データ、プローブDNAの塩基配列データに基づいて解析が行われる。解析結果はディスプレイ等の表示装置にグラフや表等の形で表示される。

【0031】図7は、画像データを解析するプログラムによる処理の概略を示すフローチャートである。画像データは撮影時間別にファイルとして保存されており、それを逐次読み出しながら解析を行い、バイオチップ上のスポット毎の蛍光強度をバックグラウンドを引いた値で数値化していく。次に、読み取り画像表示部61を表す図8を用いてデータ解析プログラムの処理内容について説明する。

【0032】まず、バイオチップ10のハイブリダイゼーションの状態を示した図8（a）の画像データを読み込む（S31）。読み込んだ画像に対して虫めがね拡大ツール83を使うことにより、画像を図8（b）に示すように適度な大きさに拡大する。次に、図8（c）に示すように、バックグラウンドの部分に適度な大きさで選択範囲ツール81、82で範囲を選択し、バックグラウンド計算ツール85を使用することによりバックグラウンドの計算を行う。このことにより、今後の蛍光強度計算は時間毎にバックグラウンドを引いた値を計算することになる。バックグラウンドを計算した後に、図8（d）に示すようにサンプルの部分を選択範囲ツール81、82で範囲選択し（S32）、強度計算ツール84を使用してスポットの蛍光強度を計算する（S33）。設定された時間間隔で撮影された画像中の同一スポットに対する蛍光強度を時間毎に計算し、そのスポットの蛍光強度の時間変化をグラフとして表示する（S34）。

【0033】図8において、実際の計算は例えば次のように行われる。画像上は白黒2値で表現してあるが、実際は1画素あたり16ビットもしくは8ビットで検出された蛍光強度を表している。虫めがね拡大ツール83によって拡大した後の画像は、数値で表現すると例えば図9のようになる。いま、この画像の試料スポット以外の部分、すなわちバックグラウンドの部分の強度を計算すると1画素あたりの平均値は20であるので、今後の計算は1画素あたり20を引くことになる。すなわち、バックグラウンド補正後の蛍光強度画像は図10のようになる。蛍光強度計算では、範囲選択ツールで囲った部分の数字を合計することにより蛍光強度を算出する。図示した例の場合、3つのスポットからなるが、それぞれのスポットの蛍光強度はそれぞれ左から33221、9118、95777となる。このような画像が設定された時間毎（図3の例の場合、5分毎）に撮影されていき、コンピュータ40内に蓄積されていく。

【0034】上述のように、スポット毎の蛍光強度及びそのときのバックグラウンドは各画像に対してその都度計算され、その値をもとに蛍光強度の時間変化（温度に対する変化）を表すグラフが作成される。なお、選択範囲ツール81, 82を用いたバックグラウンド計算のための範囲選択及びサンプルの部分の範囲選択は、1つの画像に対して行った選択範囲が他の画像に対しても適用されるので、1度だけ行えばよい。また、この範囲選択は、バイオチップ10上における各スポットの座標データ等に基づいて自動的に行うことも可能である。

【0035】図11は、こうしてコンピュータ40に蓄積されたデータをもとに作成されたグラフの一例である。このグラフは、バイオチップ10上のある一つのスポットからの蛍光強度の時間変化をバイオチップの温度変化と共に表示したものである。横軸は時間、縦軸は蛍光強度あるいは温度である。図中、実線のグラフは蛍光強度を表し、破線のグラフは温度を表す。蛍光強度は、通常は最初に低温でハイブリダイゼーションを行ったときの蛍光強度が一番強いはずであるので、このときの強度を100%として表している。この例では、バイオチップ10の温度を5°Cずつステップ的に上昇させて試料スポットからの蛍光強度の変化を観察している。温度が上昇するとプローブDNAと相補性の低い（結合力の弱い）試料DNAから解離を始め、解離した試料DNAは洗浄液によってスポットから除去されるため、時間ごとにハイブリダイズしている蛍光標識試料DNAが少なくなつて、蛍光強度は減少していくことになる。図11にはスポットの蛍光強度と共に温度のグラフも一緒に表示しており、蛍光強度の急減が起こった温度から実際に何°Cの温度のところで試料DNAがプローブDNAから解離したかが分かるようになっている。図11の例では、70°C前半で試料DNAが解離しているのが分かる。この場合、この注目しているスポット部分にハイブリダイゼーションしている試料DNAの解離温度は70°C前半であると判断される。このグラフは、必要があれば表示装置11上に表示して確認することができる。

【0036】また、通常DNAは構成されている塩基の数と種類によって前記〔数1〕のようにハイブリダイゼーションの最適温度（解離温度）を計算できる。従って、図11から判断される解離温度が計算で求められた解離温度とがほぼ等しい場合には確実にハイブリダイゼーションしたことが示され、両者が明らかにかけ離れた値である場合は非特異的に試料DNAが結合していたことが分かる。

【0037】この計算による予想解離温度を用いた判定のために、ここでは有効強度の計算を行う（S35）。図11に示すように、予想解離温度の前後でスポットの蛍光強度が急激に減少しているところがあれば、急減直前の蛍光強度が目的とする試料DNAの蛍光強度であると考えられる。低温でハイブリダイゼーションを行った

ときの蛍光強度の数値を100%として、予想解離温度付近で下がった蛍光強度を有効強度として全体の%で表示すると、プローブDNAが完全に特異的にハイブリダイゼーションしている場合は100%付近のはずである。このため、有効強度を%表示することにより、バイオチップ10上のスポットに対する信頼度の目安とすることができる。

【0038】図12に示すように、バイオチップ10上の各スポットのスポットID91に対応させて、スポットに固定されている既知のプローブDNAの塩基配列から計算された予想解離温度92と有効強度93をスポット毎に表示し（S36）、ハイブリダイゼーションが生じていたかどうかの判定94を表の形にまとめて表示する（S37）。図12の例では、判定結果は、有効強度が80%以上のときは◎を、65%以上のときは○を、40%以上の時は△を、それ以下の時は×で表示した。このように有効強度に基づいて判定表示することで、各スポット毎のハイブリダイゼーションを高い信頼性を持って検出することができる。各スポットの有効強度の数値を明るさや色に対応させて、あるいは判定結果の◎、○、△、×を明るさや色に対応させてバイオチップの各スポット位置に表示することで、バイオチップの各スポットのハイブリダイゼーションの様子を視覚的に認識することができる。

【0039】

【発明の効果】本発明によると、バイオチップにおける1スポット毎のハイブリダイゼーションの検出を定量性をもって従来の方法に比較して高い信頼度で行うことが可能になる。

【0040】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明で用いるバイオチップの一例を示す概略図。

【図2】本発明によるチップハイブリダイゼーション反応検出装置の一例の概略図。

【図3】モニター画面を説明する図。

【図4】コンピュータへのデータの流れとコンピュータによる装置各部の制御の関係を示す概略図。

【図5】ハイブリダイゼーション状態確認処理の流れを説明するフローチャート。

【図6】データ解析プログラムの処理内容を説明するブロック図。

【図7】画像データを解析するプログラムによる処理の概略を示すフローチャート。

【図8】読み取り画像表示部を表す図。

【図9】バックグラウンドを含む画像を数値で表現した図。

【図10】バックグラウンドを除去した画像を数値で表現した図。

【図11】一つのスポットからの蛍光強度の時間変化を

バイオチップの温度変化と共に表示したグラフ。

【図12】バイオチップの1スポット毎の信頼性を確認する方法を説明する図。

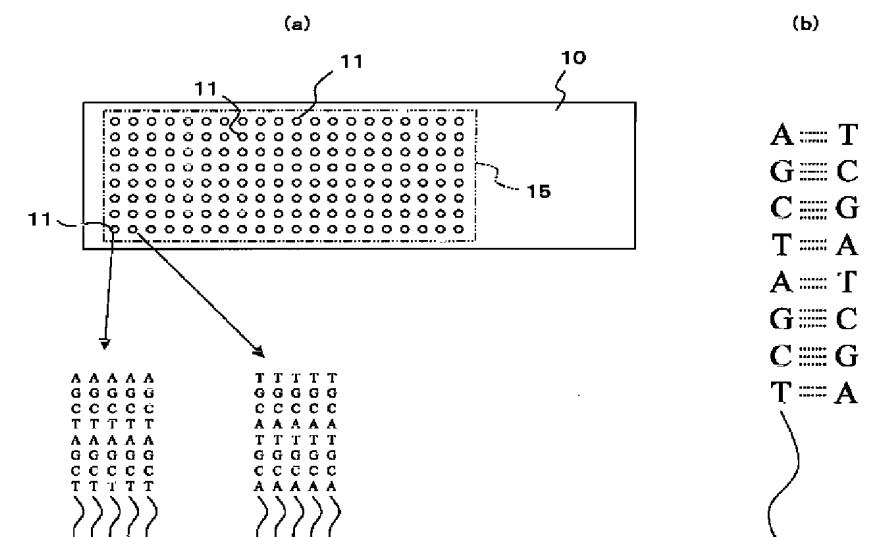
【図13】従来の方法を説明する図。

【符号の説明】

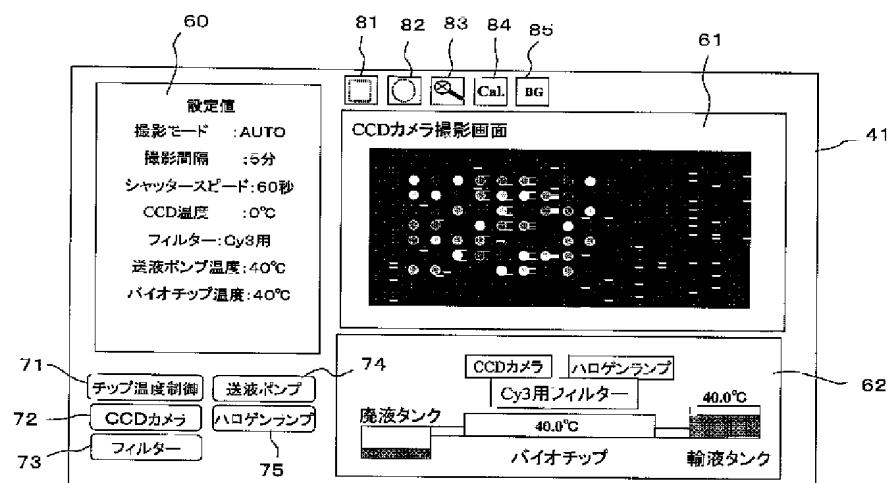
10…バイオチップ、11…スポット、15…反応領域、20…チップケース、23…加圧式輸液装置、24…吸引式排液装置、25, 26…逆流防止弁、27…溶液注入孔、31, 32…ヒートブロック、33, 34…温度計測器、40…コンピュータ、41…表示画面、50…励起光源、51…励起用光学フィルター、52…受光用光学フィルター、53…受光レンズ、55…冷却CDカメラ、56…ハロゲンランプコントローラ、57

…切り替えコントローラ、58…カメラコントローラ、60…設定値表示部、61…画像表示部、62…動作状況表示部、71…チップ温度制御ボタン、72…CCDカメラボタン、73…フィルターボタン、74…送液ボタン、75…ハロゲンランプボタン、81…選択範囲ツール（四角）、82…選択範囲ツール（丸型）、83…虫めがね拡大ツール、84…強度計算ツール、85…バックグラウンド計算ツール、91…スポットID、92…予想解離温度、93…有効強度、94…判定、110…バイオチップ、112…DNAスポット部分、114…試料DNA溶液、116…カバーガラス、120…密閉容器

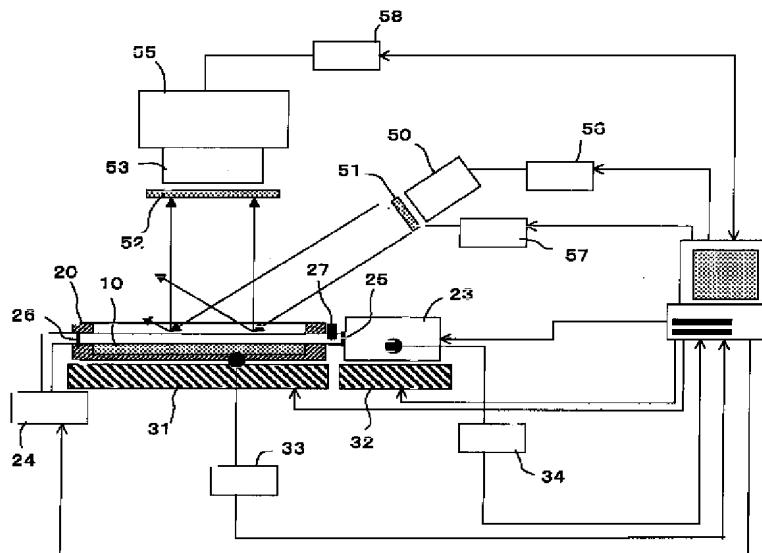
【図1】



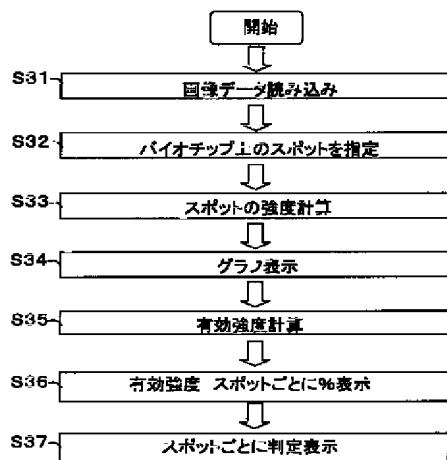
【図3】



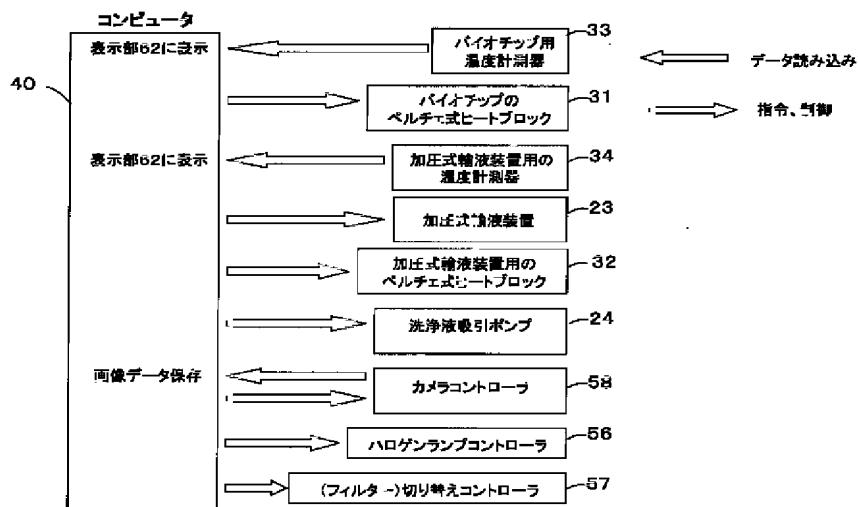
【图2】



〔図7〕

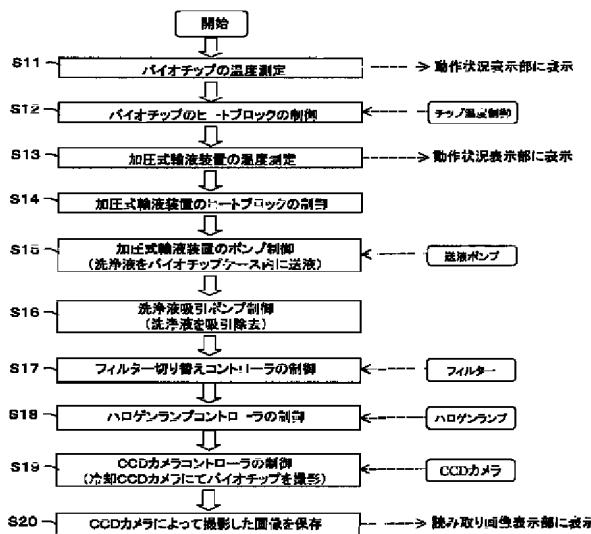


【図4】



[☒ 9]

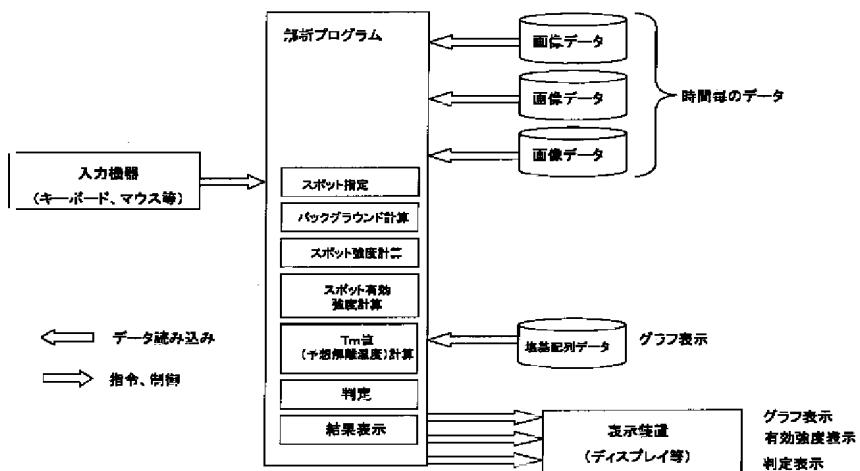
【图5】



【図12】

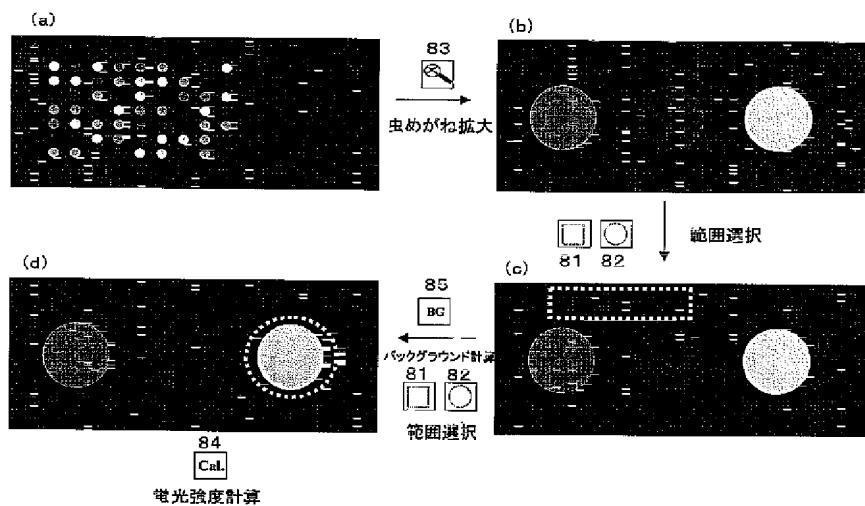
81	82	83	94
スポットID	予想解離温度(°C)	有効強度(%)	判定
1	72	80	◎
2	80	50	△
3	85	80	◎
4	80	72	○
5	78	30	×
6	80	50	△
:	:	:	:

【図6】

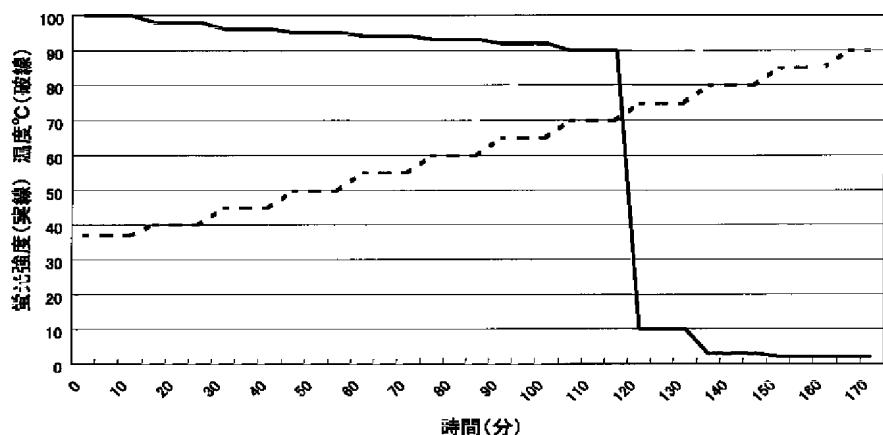


【四】10】

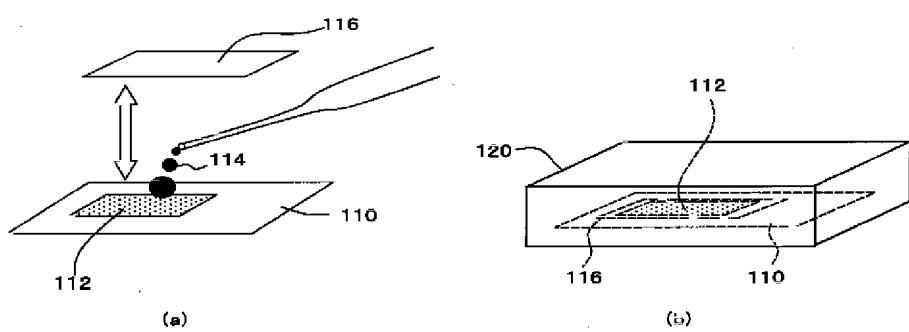
【図8】



【図11】



【図13】



フロントページの続き

(51) Int.C1. ⁷	識別記号	F I	(参考)
G 0 1 N	31/22	G 0 1 N	33/53
	33/53		35/02
	35/02	G 0 6 T	1/00
G 0 6 T	1/00	C 1 2 N	15/00
	2 8 0		2 8 0
			A

(72) 発明者	山本 顯次	F ターム(参考)	2G042 AA01 BD12 BD20 CB03 DA08
	神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地	FA11 FB05 FC01 FC09 GA01	
	日立ソフトウェアエンジニアリング株式会	HA02 HA07	
	社内	2G054 AA06 AB04 BB13 CA22 CB02	
(72) 発明者	吉井 淳治	CE01 CE02 EA03 EB03 FA06	
	神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地	FA17 FA19 FB02 GA03 GB10	
	日立ソフトウェアエンジニアリング株式会	JA04 JA05	
	社内	2G058 AA09 BB14 CC09 GA01 GD07	
(72) 発明者	水野 克也	GE01	
	神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地	4B024 AA11 CA01 HA14	
	日立ソフトウェアエンジニアリング株式会	4B029 AA07 BB20 CC01 FA02 FA07	
	社内	4B063 QA01 QA18 QQ42 QR32 QR84	
		QS20 QS22 QS34 QX02	
		5B057 AA20 BA02 BA24 CD05 DA16	
		DA20 DC22	